

原 著

睡眠状態に特異的な前頭前野の神経活動動態

大野駿太郎・野本真順・井ノ口馨

Sleep state-specific neuronal activity dynamics in the prefrontal cortex.

Shuntaro OHNO^{1,2}, Masanori NOMOTO^{1,2}, Kaoru INOKUCHI^{1,2}¹Department of Biochemistry, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences, University of Toyama²Research Center for Idling Brain Science, University of Toyama

【和文要旨】

内側前頭前野は多数の脳領域からの情報を統合しており、その機能の実現のために睡眠中の働きが注目されている。睡眠はrapid eye movement (REM) 睡眠とnon-REM (NREM) 睡眠に分けられ、それぞれが異なる様式で、様々な脳機能に貢献すると考えられているが、その神経基盤は不明である。

我々は睡眠中のマウスの内側前頭前野をカルシウムイメージング法によって撮影し、各睡眠状態に特徴的な神経活動を解析した。その結果、NREMとREM睡眠中の神経活動特性は有意に異なり、その差異は睡眠状態の切り替わりに鋭敏に反応する細胞集団によって構成されていることが明らかになった。

内側前頭前野のNREMまたはREM特異的な活動特性は長期間保存されるため、これらは回路として組み込まれた機能である可能性が高い。以上の結果は、NREMとREM睡眠の機能的役割の違いが、回路レベルで実現されていることを示唆している。

【英文抄録】

The medial prefrontal cortex integrates information from numerous brain regions, and its function during sleep has become of interest. Sleep can be divided into rapid eye movement (REM) and non-REM (NREM) sleep, each of which is thought to play distinct roles in various brain functions, but its neural basis is unknown. We recorded the cell activities in medial prefrontal cortex of sleeping mice using calcium imaging and analyzed the neuronal activity characteristic of each sleep state. The results revealed that the characteristics of neural activity during NREM and REM sleep differ significantly and that the differences are attributed to cell populations that acutely response to the sleep state switching. NREM or REM-specific activity properties in the medial prefrontal cortex are likely to reflect hard-wired functions, as these were preserved over time. We demonstrate that the hard-wired circuits contribute to the distinct functional roles of NREM and REM sleep.

Key words: Sleep, Prefrontal cortex, Calcium imaging

はじめに

内側前頭前野は記憶の定着や意思決定に重要な脳領域であり、外界の状況文脈と、それに対する感情などの内的な反応を結び付ける役割を果たすと考えられている¹⁾。実際、内側前頭前野は他の新皮質領域や視床、扁桃核、海馬など、様々な領域からの投射を受け、それらの情報を統合している²⁾。こうした情報統合の機能を果たすには、新規の刺激が次々と流れ込んでくる覚醒時よりも、外部からの情報入力に限られた安静時や睡眠時の方が適している^{3,4)}。

睡眠は大まかに、急速な眼球運動を伴うRapid Eye

Movement (REM) 睡眠と、それ以外の時間帯のnon-REM (NREM) 睡眠に分けることができる。NREMとREM睡眠は学習の文脈においてそれぞれ異なる役割を果たすと考えられており、NREM睡眠中は脳新皮質と海馬が積極的な連絡を行っているのに対し、REM睡眠中はこの連絡が遮断され、脳新皮質は独立した活動パターンを示すようになるというモデルが提案されている⁵⁾。これにより、NREM睡眠中は覚醒時に得た情報の定着、REM睡眠中は異なる情報の統合を行うことで、創造性の発現が可能になると想定される。しかし、NREMおよびREM睡眠それぞれの状態の中で、とくに

(受稿2022.8.29/受理2022.9.22)

¹富山大学 学術研究部 (医学系) 生化学講座²富山大学 アイドリング脳科学研究センター

情報統合に重要な役割を果たす内側前頭前野において、具体的な神経活動の特性にどのような違いがあるかは不明であった。

我々は睡眠中の内側前頭前野の神経活動を観察するため、カルシウムイメージング法による計測を行った。この手法では、カルシウム濃度依存的な輝度変化を示すカルシウムインジケータG-CaMPを神経細胞に導入し、神経活動に伴うカルシウム流入を神経活動の指標として記録している⁶⁾。記録された神経活動のデータに基づいてNREMおよびREM睡眠における神経活動特性の違いを検証した後、この違いを生み出す特徴的な神経細胞集団を抽出した。最後に、それらの神経細胞集団や、内側前頭前野全体の神経回路網としての特性が、時系列的にどのような変化をするのかについて解析した。

材料と方法

I. 睡眠中の神経活動の計測

本論文における動物実験は、富山大学動物実験委員会により承認され（承認番号：A2019MED-35, A2022MED-7）、国立大学法人富山大学動物実験取扱規則に従って実施された。同様に、遺伝子組換え実験も富山大学遺伝子組換え生物等使用実験安全管理委員会により承認され（承認番号：G2018MED-5, G2020MED-4）、国立大学法人富山大学遺伝子組換え生物等使用実験安全管理規則に従って実施された。

我々は、睡眠中の神経細胞のカルシウムイメージングを行うため、3-5ヶ月齢のマウスに麻酔下でSynI::janelia G-CaMP7bウイルスを右側内側前頭前野（-2.0mm AP, +0.3mm ML, +2.2DV from bregma）に導入した。2週間の回復期間の後、再び麻酔下でGRIN（Gradient Index）レンズを注入中心に挿入し（図1A）、同時に局所脳波（electroencephalogram: EEG）と筋電位（electromyogram: EMG）を計測するため、特注のEEG/EMG 5ピンシステム⁷⁾とともに、歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。

睡眠実験は6日間にわたって行い、うち1, 2, 6日目の睡眠時にカルシウムイメージングを行った。内側前頭前野の興奮性神経細胞に発現するG-CaMP7タンパク質から生じるCa²⁺シグナルをInscopix社のnVistaシステムによって20Hzで記録し、同様にInscopix社のデータ処理ソフトウェアを用いて動画の結合と動き補正を行った後、各セッションの蛍光信号の強度変化（dF/F）を計算した（図1B）。このデータを、細胞自動選別システムであるHOTARU⁸⁾で解析して細胞を同定し、時間×神経細胞の2次元形式で抽出した。

カルシウム蛍光と同時に頭頂皮質領域に留置したネジ電極からEEG、頸部の筋肉に留置したワイヤー電極からEMGを取得し、アンプで信号を増幅した後、覚醒または睡眠状態の判定のために使用した。まず、EMGの

二乗平均平方根を計算し、静止中と睡眠中を区別する閾値を各マウスで目視にて決定し、値が閾値を下回った時間帯を睡眠中と判定した。さらに、EEGからはデルタ波（1-4Hz）とシータ波（6-9Hz）のパワーを計算し、それらの比をデルタ/シータ比（D/T比）として睡眠ステージの判定のために保存した。過去の報告より、マウスの覚醒および睡眠状態と、EEGおよびEMGから計算した指標を同時にプロットすると、覚醒と睡眠はEMGの時間積分によって、NREM睡眠とREM睡眠はD/T比によって高精度で区別できることが知られている⁹⁾。具体的には、REM睡眠中にはシータ波優位となるため、D/T比は小さくなり、逆にNREM睡眠中ではデルタ波優位となり大きくなる。この知見に基づく覚醒および睡眠状態の判定基準はAlyら⁴⁾や宮本ら⁷⁾によっても使用されている。後述する相対population vectorの算出に際し、我々はD/T比の時系列データを10秒ごとに分割・平均した値に基づいてNREMおよびREM睡眠の時間帯を簡易的に判定した。ただし、ここでは睡眠状態をNREMまたはREM睡眠のいずれかの状態に二分する上でより適切な境界を設定するため、判定の閾値をK-meansクラスタリングによって決定した¹⁰⁾（図1C, D）。

II. NREM特異性またはREM特異性を表現する指標の開発

計測視野内の細胞全体としての活動傾向を評価するために、相対population vectorという指標を開発した。これはV_{NREM}とV_{REM}の1対のベクトルで構成され、それぞれの要素数は細胞数に等しい。V_{NREM}（V_{REM}）のi番目の要素には、i番目のIDが与えられた細胞のdF/F値の全時間積分のうち、NREM（REM）睡眠中のみでの時間積分の割合が入る。そのため、V_{NREM}とV_{REM}の各要素の和はすべて1になる（図1E）。この2ベクトルが成す角度 θ を求めることで、睡眠状態に依存した細胞活動の偏りを評価することができる（図1F）。すなわち、活動の比率がすべての細胞についてNREM:REM=0.5:0.5となる場合には $\theta=0^\circ$ となるが、NREM:REM=0.9:0.1等の偏りが生じた細胞が増えると θ は 90° に近づく。ただし、NREMとREM睡眠の長さが異なるため、細胞活動と睡眠状態に関係がない場合でも活動比率がNREM:REM=0.5:0.5となるとは限らない。そこで我々は、乱数を用いて各細胞のdF/F値をランダムに時間シフトしてシャッフルデータを作成した。これを用いて同様の相対population vectorと角度の計算を行うことで、データの特性を反映しつつ、細胞活動が睡眠状態に依存しない場合に想定される角度の分布を求めることができる。我々は、各マウスとイメージングを行った日付（1, 2, 6日目）ごとに100個のシャッフルデータを作成して角度の分布を求め、実際の θ の値と比較した（図1G）。

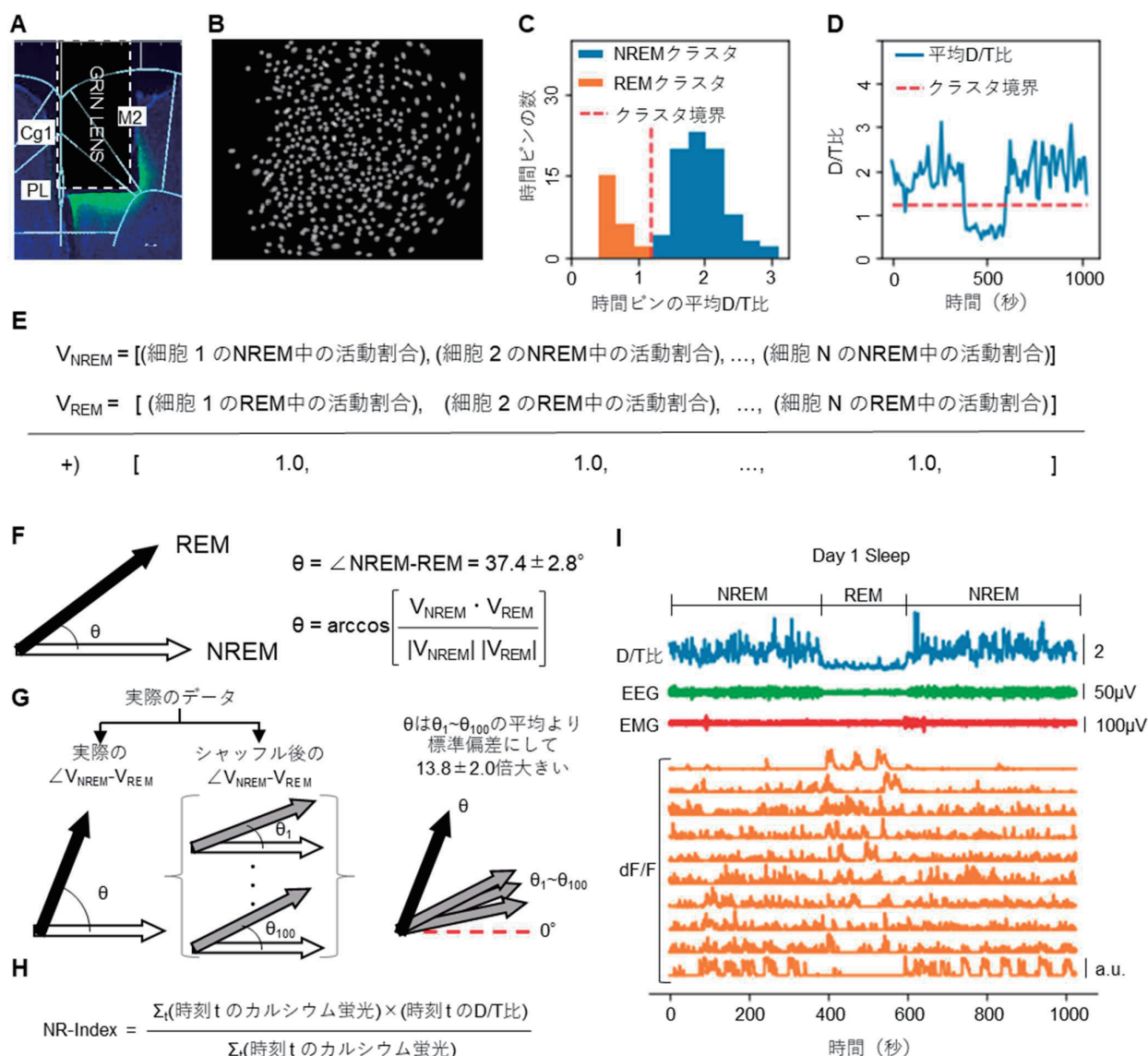


図1 NREMとREM睡眠中の細胞活動

(A) GRINレンズの留置位置。(B) 検出された細胞のフットプリント。(C) D/T比のデータを10秒ごとに分割して時間ビンとし、その区間のD/T比の平均値をもとにプロットしたヒストグラム。K-meansクラスタリングによって分割されたNREMまたはREM睡眠期間に対応するビンごとに色分けを行った。(D) 10秒ごとに分割して平均をとったD/T比の時系列と、K-meansクラスタリングによるクラスタ分類の決定境界。(E) 相対Population Vectorの定義。Population Vectorは各細胞の全活動量に占めるNREM/REM睡眠中の割合を表現するため、 V_{NREM} と V_{REM} の各成分の和は1になる。(F) NREMとREM睡眠中における細胞活動の違いを、相対population vectorが成す角度から表現した図。(G) シャッフルデータから計算された角度のばらつきと、実際の $V_{NREM}-V_{REM}$ の角度の関係を示した模式図。(左) 各マウスの各日付から得られたデータについて、実際の $V_{NREM}-V_{REM}$ の角度を求めると同時に、データをシャッフルした場合の $V_{NREM}-V_{REM}$ の角度を100回計算した。(右) すべてのデータに対する結果を総合すると、すべてのマウスと日付について、実際のデータから算出された角度は、シャッフルデータから計算された角度の分布の平均に対し、分布の標準偏差の 13.8 ± 2.0 倍の大きさを持った。(H) NR-Indexの定義式。(I) ID:4のマウスについて、1日目の睡眠中に得られたD/T比、EEG、EMGを上段にプロットした。下段には、全細胞(559個)をNR-Indexによって10分割し、上から順にNR-Indexが小さくなるように10細胞を選び、そのカルシウム蛍光値(dF/F)をプロットした。dF/F値は細胞ごとに最大値によってスケールした。(a.u.: arbitrary unit.)

また、個々の細胞の神経活動がNREMまたはREM睡眠中に集中している場合の偏りの程度を量的に評価するため、我々は各神経細胞のdF/F値と睡眠時間中のD/T比の積を標準化した指標(NR-Index)を開発した(図

1 H)。NR-Indexは、睡眠中の神経活動がNREM睡眠中に偏っていた場合は大きく、REM睡眠中に偏っていた場合は小さくなる。我々は、前者のようにNREM睡眠中にのみ激しく活動し、REM睡眠中には活動が著しく

低下する細胞をNREM特異細胞, その逆の挙動を示す細胞をREM特異細胞と呼称した。

結 果

D/T比に基づくK-meansクラスタリングによって, 睡眠状態はNREMまたはREM睡眠に適切に分類された(図1 C, D)。図1 Cのヒストグラムから, 平均D/T比の分布は2群に分かれることが明白であり, クラスタ境界はこれらを正しく区別した。内側前頭前野の神経細胞全体におけるNREM/REM睡眠中の活動特性の違いを検証するために計算した相対population vectorが成す角度は $37.4 \pm 2.8^\circ$ であった(図1 F)。それぞれのマウス・日付ごとのデータの特性を考慮して, 偶然により生じる角度との差異を検討するために, この角度とシャッフルデータから計算した角度の分布との比較を行った。その結果, すべての場合について, 実際のデータから計算された角度は, シャッフルデータから計算された角度の平均よりも, 分布の標準偏差の 13.8 ± 2.0 倍大きな値を取っ

ていた(図1 G)。すなわち, すべてのマウス・日付において, 内側前頭前野の神経細胞全体のふるまいはNREMとREM睡眠間の状態変化に伴って大きく変化していることが示された。

睡眠中の神経活動の全体像は図1 Iの通りである。ここではNR-Indexにしたがって全細胞をソートし, 最小から最大の値を持つ細胞が均等に取り上げられるように代表的な10個の細胞を表示した。最小のNR-Indexを持つ細胞(dF/F最上段)はその活動のほとんどがREM睡眠中に集中し, NR-Indexが大きくなると活動割合が均等になり, 最終的にはREM睡眠での活動がほとんど見られなくなった(dF/F最下段)。

次に, 上記のような活動特性の違いを生み出すと考えられるNREMおよびREM特異細胞群に注目し, それら個々の活動特異性の時間的变化について検証した。図1 Iの最上・下段のように, NR-Indexが小さい・大きい細胞を抽出すると, これらの細胞の活動がNREM睡眠あるいはREM睡眠に対し非常に特異的であった(図2

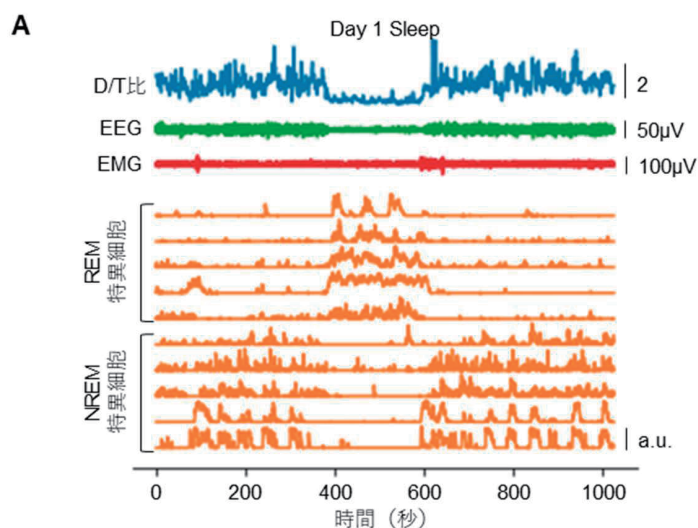
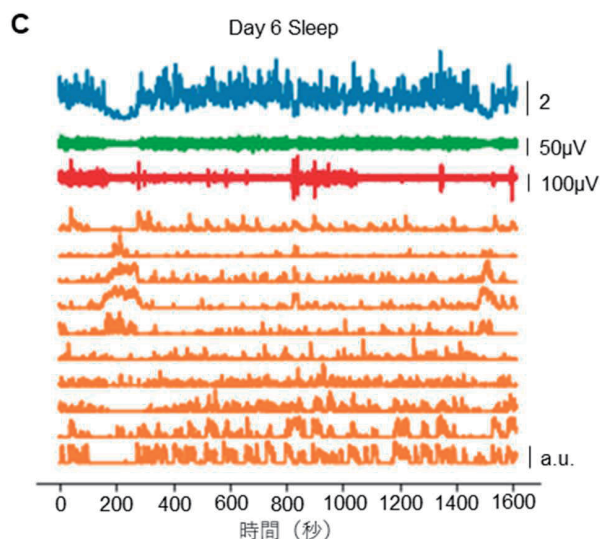
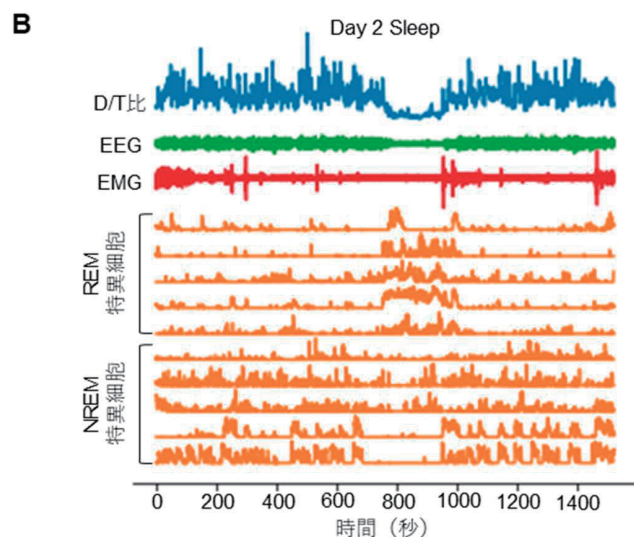


図2 NREMまたはREM特異細胞の保存性の追跡

(A) ID: 4のマウスについて, NR-Indexが上位・下位の神経細胞(すなわち, NREM/REM特異細胞)から各5個ずつ抽出し, カルシウム蛍光値をD/T比, EEG, EMGと並べてプロットした。

(B) 1日目の睡眠時にNREMまたはREM特異細胞と判定された(Aで抽出されたものと同じIDの)細胞について, 2日目の睡眠中のカルシウム蛍光値をD/T比, EEG, EMGと並べてプロットした。(C) Bと同様のことを, 6日目の睡眠に関して行った。(a.u.: arbitrary unit.)



A)。なお、1日目の睡眠中のデータからNREMまたはREM特異的であると判断された細胞の活動を、2、6日目の睡眠中にも追跡すると、そのほとんどがNREMまたはREM特異性を保っていた(図2B, C)。

これらの結果は実験に用いたすべてのマウスについて見出され、異なる日の睡眠中に得られたNR-Indexの値は有意な正の相関を示した(図3A)¹¹⁾。そして、NR-Indexが大きい・小さい細胞(すなわち、NREMあるいはREM睡眠に特異的な活動特性を示す細胞)の空間分布には、特に偏りが見られなかった(図3B)。

考 察

本研究により、内側前頭前野には、NREMまたはREM睡眠時に特異的な活動特性を示す細胞集団が、空間的な細胞局在に依存せず均一に分布して存在することが示された。また、その細胞特性は日を跨いでもほとんど変化しなかった。

学習により神経細胞(特に興奮性神経細胞)間の結合強度が変化し、神経ネットワークの相対的關係により各細胞の活動特性が変化するという脳の可塑的な機能を考慮すると、睡眠中のこうした固定的な性質は、NREM

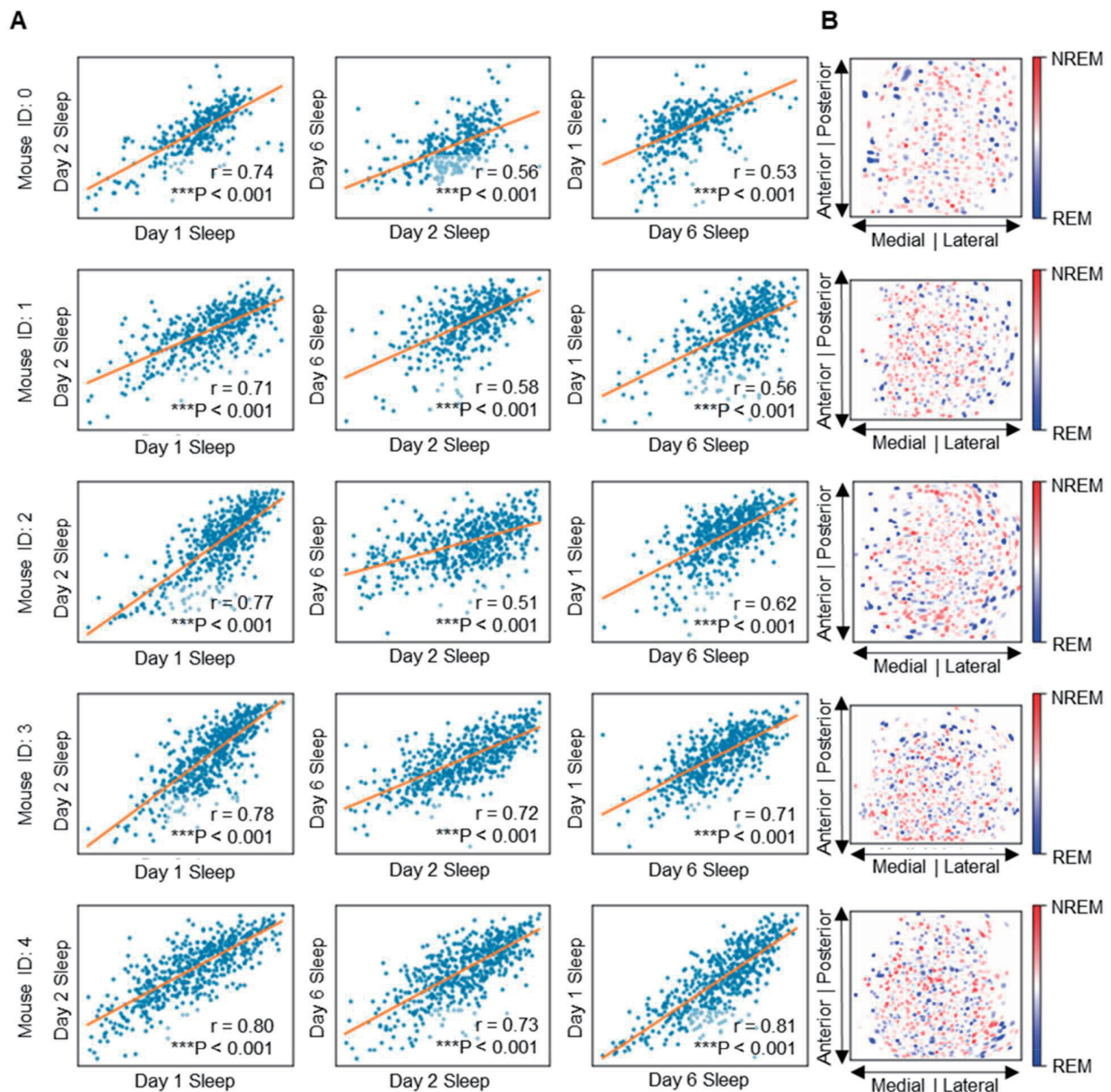


図3 日を跨いだNR-Indexの一貫性と細胞空間分布

(A) 実験に用いた5匹のマウスについて、1、2および6日目の睡眠で得られた各細胞のNR-Indexの相関を示した。これらのピアソン相関係数は、Kowalskiの検定によりすべて有意な正の値と判定された(***P<0.001)。検出された細胞数はそれぞれ、ID 0: 347個、ID 1: 455個、ID 2: 546個、ID 3: 568個、ID 4: 559個であった。(B) 各マウスの計測視野における、1日目の睡眠のNR-Indexの空間分布。

またはREM睡眠に対して特徴的な反応を示す①他の脳領域からの入力による制御, または②抑制性局所回路による制御, もしくはその両方によるhard-wiredなメカニズムの影響を強く受けていると考えることができる。例えば外側前頭前野のⅡ/Ⅲ層の神経細胞は, それぞれ parvalbumin (PV), vasoactive intestinal peptide (VIP), somatostatin (SOM) 陽性の抑制性神経細胞によって構成される, 局所的な抑制ネットワークによって制御され, この抑制ネットワークが外部脳領域 (例えば中内側視床) からのREM睡眠特異的な入力を受けることによって, 細胞体と樹状突起のREM睡眠特異的な活性化パターンを示すことが知られている¹²⁾。

同様の局所抑制ネットワークは脳全体に広く存在する^{13,14)}。とくに内側前頭前皮質では, 睡眠中に抑制性細胞が外部からの活性化を受けることによって, 海馬や視床など様々な領域から受ける入力を効率的に分離できる可能性が示唆されている¹⁵⁾。したがって, 上記①他の脳領域からの制御と②抑制性局所回路の両方の要因が, NREM特異細胞とREM特異細胞を生み出している可能性が高い。

図2B, Cを詳細に観察すると, ほとんどのNREMまたはREM特異細胞は6日間非常によく保存されているが, うちいくつかはその特徴を変化させているようにも見受けられる (例えば, 最上段のREM特異細胞)。図3の結果から, こうした変化は神経細胞全体の反応特性に大きな影響を与えていないが, こうした微細な変化が学習を反映していることは否定できない。

今後の研究の方向性として, 図2で見られたようなNREMとREM睡眠の切り替わりに対し非常に敏感な反応を示す神経細胞集団の存在が, 内側前頭前野に特有のものであるかを検証することは重要である。前述の局所抑制ネットワークを構成する抑制性細胞の中でも, 内側前頭前野においてはPV陽性細胞の割合が少ないことが知られており²⁾, こうした他の脳領域との差異が, 明瞭なNREMまたはREM特異細胞を生み出しているかもしれない。また, NREMあるいはREM特異細胞が, 覚醒中にどのような情報をコードしているのかを調べる必要もあるだろう。その結果, NREM睡眠中は外界からの刺激と内的な情動などの反応がコードされた細胞群が激しく活動して記憶の定着を促進する一方, REM睡眠中は様々な状況文脈の情報をコードした細胞群が活発なランダム発火をすることによって創造的な概念形成を行っている, といった, 睡眠状態の役割のモデルを神経基盤から説明することが可能になるかもしれない。こうしたhard-wiredに実装された機能と, それがもたらすsoftな神経可塑性への影響をそれぞれ分析することで, これまで100年余りに渡って研究されてきた, 脳機能における睡眠の重要性の正体を明らかにできると考えられる。

【謝辞】

本研究は日本学術振興会 科学研究費助成事業 特別推進研究 (研究課題番号: JP18H05213), 基盤研究 (B) (20H03554), 公益財団法人富山第一銀行奨学財団「研究活動に対する助成」, 武田科学振興財団 医学系研究助成, 成茂神経科学研究助成基金, ほくぎん若手研究者助成金, 田村科学技術振興財団の助成を受けたものです。

【文献】

- 1) Euston D. R., Gruber A. J. and McNaughton B. L.: The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making, *Neuron*. **76**: 1057-1070, 2012.
- 2) Anastasiades P. G. and Carter A. G.: Circuit organization of the rodent medial prefrontal cortex, *Trends Neurosci.* **44**: 550-563, 2021.
- 3) Rasch B. and Born J.: About sleep's role in memory, *Physiol. Rev.* **93**: 681-766, 2013.
- 4) Aly M. H., Abdou K., Okubo-Suzuki R., et al.: Selective engram coreactivation in idling brain inspires implicit learning, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **119**: e2201578119, 2022.
- 5) Lewis P. A., Knoblich G. and Poe G.: How memory replay in sleep boosts creative problem-solving, *Trends Cogn. Sci.* **22**: 491-503, 2018.
- 6) Stosiek C., Garaschuk O., Holthoff K. and Konnerth A.: In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **100**: 7319-7324, 2003.
- 7) Miyamoto D., Hirai D., Fung, C. C., et al.: Top-down cortical input during NREM sleep consolidates perceptual memory, *Science*. **352**: 1315-1318, 2016.
- 8) Takekawa T., Asai H., Ohkawa N., et al.: Automatic sorting system for large calcium imaging data, *bioRxiv*. 2017.
- 9) Kohtoh S., Taguchi Y., Matsumoto N., et al.: Algorithm for sleep scoring in experimental animals based on fast Fourier transform power spectrum analysis of the electroencephalogram, *Sleep and Biological Rhythms*. **6**: 163-171, 2008.
- 10) Yaghoubi F. and Sunderam S.: SegWay: A simple framework for unsupervised sleep segmentation in experimental EEG recordings, *MethodsX*. **3**: 144-155, 2016.
- 11) Kowalski C. J.: On the effects of non-normality on the distribution of the sample product-moment correlation coefficient, *Journal of the Royal Statistical Society. Series C (Applied Statistics)*. **21**: 1-12, 1972.
- 12) Aime M., Calcini N., Borsa M., et al.: Paradoxical somatodendritic decoupling supports cortical plasticity during REM sleep, *Science*. **376**: 724-730, 2022.
- 13) Niethard N., Hasegawa M., Itokazu T., et al.: Sleep-stage-specific regulation of cortical excitation and inhibition, *Curr. Biol.* **26**: 2739-2749, 2016.

- 14) Niethard N., Ngo H. V., Ehrlich I., Born J.: Cortical circuit activity underlying sleep slow oscillations and spindles, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **115**: 9220–9229, 2018.
- 15) Peyrache A., Battaglia F. P., Destexhe, A.: Inhibition recruitment in prefrontal cortex during sleep spindles and gating of hippocampal inputs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **108**: 17207–17212, 2011.